

BIOCHIMICA

- MACROMOLECOLE INFORMAZIONALI -

LA BIOCHIMICA NEL TEMPO:

- Pasteur → organismi viventi e processi
- 1887 Bucher → mostrano la fermentazione in estratti cellulari
- descrizione della glicolisi
- descrizione del ciclo di Krebs
- isolamento di frazioni mitocondriali
- sequenza amminoacidica di una proteina
- 1953 → Watson e Crick: struttura a doppia elica del DNA
- anni 1960 → Perutz: struttura tridimensionale di una proteina
- codice genetico
- tecniche di clonaggio di DNA
- progetto Genoma umano
- era post-genomica: genomica funzionale
- proteomica (espressione delle proteine nei singoli tessuti)

BIOCHIMICA → studia e descrive la struttura, l'organizzazione e le funzioni della materia vivente in termini molecolari.

- 1- struttura chimica dei componenti
- 2- interazioni a dare complessi sopramolecolari e strutture complesse
- 3- estrazione dell'anello dall'ambiente
- 4- mantenimento dell'informazione, suo utilizzo e passaggio alle generazioni successive
- 5- crescita, differenziamento, invecchiamento

CAMPI della BIOCHIMICA:

- biochimica strutturale
- studio del metabolismo (vie metaboliche e regolazione)
- biochimica dell'informazione genetica

BIOCHIMICA	←→	BIOLOGIA MOLECOLARE
------------	----	---------------------

- ricerca medica: patologia, nutrizione, fisiologia
- farmacologia
- microbiologia
- biotecnologie
- ambiente, ecc

ELEMENTI del CORPO UMANO:

ELEMENTO	%
H	66
O	25.5
C	9.5
N	1.4

Inoltre sono presenti altri elementi in piccole tracce come: P,S,Ca,Cl,K,Mg,Na,Co,Cu,Fe,Mn,Zn.

Enel di legame Kcal/mole	Legami covalenti
~ 800	Si—O
~ 500	C—F
~ 400	C—H
~ 380	C—OH
~ 370	C—NH ₂
~ 320	C—C
~ 250	C—I
~ 150	C—NO

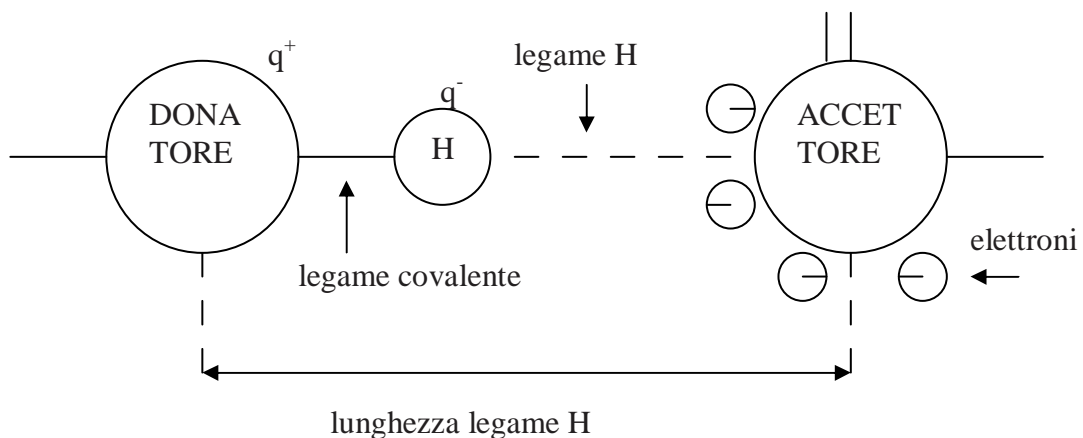
Vi sono anche altri legami importanti tra i quali:

- *legami H*
- *Forze di Van der Waals*
- *Interazioni elettrostatiche*
- *Legami non – covalenti*

Il **complesso sopramolecolare** è un'insieme di proteine diverse che interagiscono tra loro con legami deboli.

IL LEGAME H:

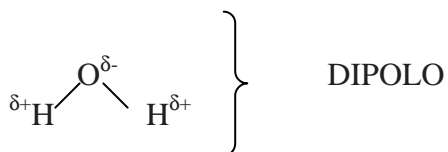
- Interazione tra un atomo di H legato covalentemente a un gruppo donatore (--OH ; =N--H) ed una coppia di e- spaiati di un gruppo accettore (O=C-- ; =N--)
- Importante l'elettronegatività dell'atomo del gruppo donatore:
 $\text{F}(4) > \text{O}(3.5) > \text{N}(3.0) > \text{C}(2.5) > \text{H}(2.1)$
- Il legame H ha un parziale carattere covalente e l'entalpia di legame è di ~ 20kJ/mole
- È altamente direzionale (orizzontale, nuclei paralleli, se si presenta qualche angolatura l'entalpia diminuisce)



LUNGHEZZA del LEGAME H: distanza tra il nucleo del donatore e quello dell'accettore (nm).

La lunghezza per far sì che tra un atomo di O e di H si crei un legame debole (Van der Waals), occorre una distanza di 0.26nm mentre x gli altri casi:

Donatore-----Accettore	Lunghezza legame	Commenti
--O—H-----O—H	0.28 ± 0.01	Nell'H ₂ O
--O—H-----O=C=	0.28 ± 0.01	Tra H ₂ O e altre molecole
=N—H-----O—H	0.29 ± 0.01	Tra H ₂ O e altre molecole
=N—H-----O=C=	0.29 ± 0.01	Proteine e acidi nucleici
=N—H-----N=	0.31 ± 0.02	Proteine e acidi nucleici
=N—H-----S=	0.37	Relativamente raro

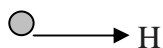
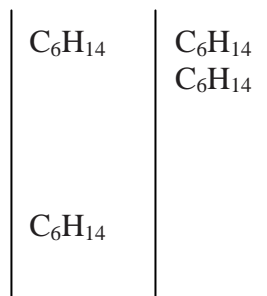
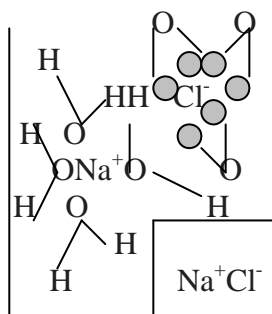


Ciascuna molecola di H₂O può formare 4 legami H con una media di 3.4 legami H x molecola e nell'acqua liquida si formano e disfano continuamente legami, mentre quando l'H₂O è solida si formano 4 legami.

RUOLO DELL'H₂O NEI SISTEMI BIOLOGICI→

Proprietà dell'H₂O:

- punto di fusione 0°C
- punto di ebollizione 100°C
- densità massima a 4°C = 0.997
- alta viscosità, tensione superficiale, coesione
- elevata costante dielettrica (78.54 ~ 80)
- elevato calore specifico
- comportamento come solvente: molecole *idrofile*, *idrofobiche*, *antipatiche*
- forma legami H coi soluti
- interagisce elettrostaticamente coi soluti carichi
- gas polari poco solubili in H₂O (N₂; CO₂; O₂)
- le molecole non polari tendono ad unirsi per attrazione idrofobia
- le molecole polari vengono idratate



L'H₂O presenta una struttura ordinata e stabile a CLATRATO
Le molecole idrofobiche diminuiscono l'entropia

INTERAZIONI DI VAN der WAALS:

- sono importanti se in gran numero
- enel di legame di ~ 4kJ/mole
- la distanza tra i 2 nuclei deve essere = alla somma dei raggi di Van der Waals
- se 2 atomi sono legati covalentemente il raggio è minore

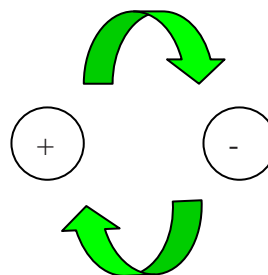
ATOMI	RAGGIO (nm)
H	0.12
O	0.14
N	0.15
C	0.17
S	0.18
P	0.19

INTERAZIONI CARICA – CARICA:

Legge di Coulomb → $F = K \frac{q_1 \cdot q_2}{\epsilon \cdot r^2}$

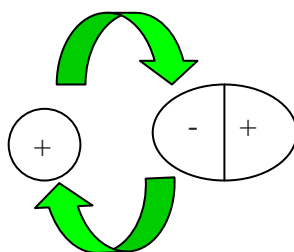
ϵ = costante dielettrica
F positiva: repulsione
F negativa: attrazione

r	F
++	+
--	+
+-	-

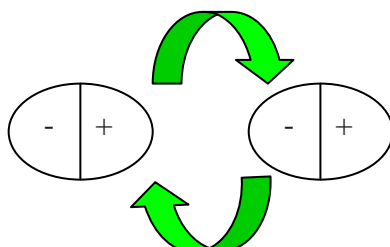


CARICA – DIPOLO:

CARICA – DIPOLO indotto



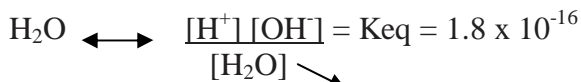
DIPOLO – DIPOLO:



Le molecole antipatiche presentano una parte idrofobia ed una idrofila.

GLI EQUILIBRI IONICI:

Il comportamento di tutte le macromolecole dipende dallo stato di IONIZZAZIONE:



55.5 M

$$55.5 * 1.8 \times 10^{-16} = 1 \times 10^{-14} \text{ M}^2 = K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] \text{ (prodotto di ionizzazione dell'acqua)}$$

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

ACIDI – BASI – SOLUZIONI TAMPONE:

Acido → donatore di H^+

Base → accettore di H^+

Acido (e base) debole → $\text{AH} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$; la costante di dissociazione è: $K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{AH}]}$

$$\text{pK}_a = -\log K_a$$

EQUAZIONE DI HENDERSON – HASSELBACK:

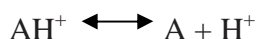
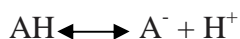
$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

pK_a = al valore di pH per il quale si ha che $[\text{A}^-] = [\text{AH}]$

Se $K > 1$ allora la sostanza è fortemente dissociata

Se $K < 1$ allora la sostanza è debole cioè indissociata

Quando $K = 1$, ovvero quando $\frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]} = 1$, allora $\text{pH} = \text{pK}$



Una base coniugata carica (A^-) si idrata prima di (A)

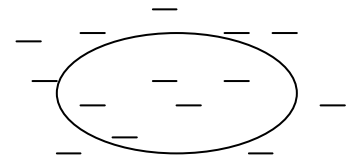
$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{AH}]} \quad [\text{H}^+] = K_a * \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]} \quad -\log[\text{H}^+] = -\log K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

L' H_2O fa da schermo alla riassociazione, se si abbassa la costante dielettrica (con solventi organici), il pK si alza e l'acido diventa + debole (si associa).

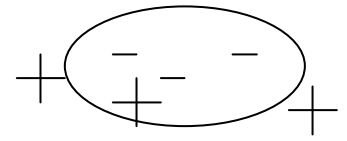
AMMINOACIDI e PROTEINE:

Il **p.I.** → valore di pH a cui la molecola ha carica netta = 0: $\frac{\text{pK}_a + \text{pK}_b}{2}$

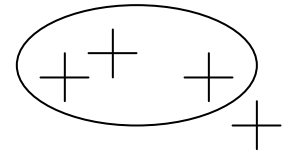
A pH elevato la proteina è solubile (deprotonata; solo cariche negative)



Al punto isoelettrico si hanno aggregati proteici



A pH basso la proteina è solubile (protonata; cariche positive)



FUNZIONI BIOLOGICHE:

Enzimi e proteine di:

- trasporto (membrana, ormoni)
- riserva (piante, cotiledoni, ecc.)
- contrattili (muscoli)
- strutturali (struttura cellulare)
- difesa (anticorpi)
- regolatrici (ormoni)

Oligopeptidi, polipeptidi, proteine

Gruppi prostetici

La funzione di una proteina dipende dalla sua sequenza aa che è fondamentale x la sua struttura tridimensionale e funzioni:

- proteine con funzioni diverse hanno sequenze diverse
- proteine mutate → malattie genetiche
- proteine funzionalmente simile da specie diverse hanno sequenze simili
- 20 – 30% delle proteine umane sono polimorfe

Il **p.m.** della proteina è = alla somma dei **p.m.** degli aa (che di media è ~110)

Il *citocromo* è una proteina presente in tutti gli organismi (nell'uomo nei mitocondri) e alcuni aa sono mutati ma altri sono rimasti = perché sono fondamentali x svolgere la funzione.

STRUTTURE delle PROTEINE:

- 1) primaria
- 2) secondaria
- 3) terziaria
- 4) quaternaria

1) struttura primaria →

la sequenza va dall'**N-terminale** al **C terminale**

AA non – polari	GLY – ALA – VAL – LEU – ILE – PRO
AA polari	SER – THE – CYS – MET – ASN – GLN
AA aromatici	PHE – TYR – TRP
AA positivi	LYS – ARG – HIS
AA negativi	ASP – GLU

Gli aa esistono in natura per la maggior parte nella forma L – aa

I **peptici** → reazione endoergonica ($\Delta G = 10 \text{ kJ/mole}$) si ha l'eliminazione di una molecola di H_2O ; il legame avviene tra il gruppo amminico di un aa e il gruppo carbossilico del secondo aa.

Le proteine potrebbero idrolizzarsi solo in presenza di un catalizzatore.

Il legame peptidico è planare e ha carattere di doppio legame e ha un parziale carattere polare.

SCHELETRO dei PEPTIDI →

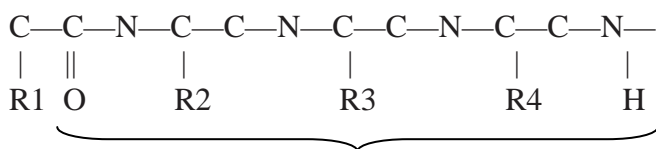
Secondo Pauling i requisiti dei polipeptidi sono:

- lunghezze legame e angoli fisse
- 2 atomi non possono avvicinarsi + del raggio di Van der Waals
- legami non covalenti stabilizzano la struttura (legami H)
- alfa – elica
- foglietti – beta

2) struttura secondaria →

ALFA – ELICA:

- destrorsa (dal basso verso l'alto in senso antiorario)
- 3.6 residui per giro
- 13 atomi x giro
- passo per residuo (distanza tra 2 residui sull'asse): 1.5 Å
- passo per giro: 5.4 Å ($3.6 * 1.5$)
- rotazione x residuo: 100°
- unità ripetitiva: 18 residui
- tenuta insieme da legami H tra l'ossigeno del gruppo carbonilico e l'N del gruppo amminico
- legami H paralleli all'asse dell'elica
- carattere dipolare (cariche residue +: NH_2 e cariche residue -: COO)
- le catene laterali sono all'esterno dell'elica



STABILITA' ALFA – ELICA:

- sequenza aa
- interazioni tra catene laterali degli aa (residui carichi – e residui carichi +) destabilizza
- forma e dimensioni catene laterali: disturbi
- interazioni tra catene laterali spaziate di 3 aa o 4 aa (stabile o no a seconda dei R)
- presenza di residui di PROLINA destabilizza

L'alfa – elica antipatica presenta una metà idrofobia e metà idrofila, inoltre può ripiegarsi grazie a dei **loop** e assumere anche delle strutture a *coiled – coil*.

FOGLIETTI – BETA:

- legami H giacciono sul piano del foglietto
- le catene laterali R → una volta sopra e una volta sotto il piano alternativamente
- filamenti antiparalleli o paralleli
- nei filamenti antiparalleli possono esserci anse (loop x cambiare direzione) o alcuni gruppi C=O e NH non fanno legame ma interagiscono con l' H_2O

- nei filamenti antiparalleli i legami H sono lineari; in quelli paralleli sono obliqui

MOTIVO→è una struttura supersecondaria

- elica – loop – elica
- mano E – F (E – F hand)
- il Ca^{++} si lega con aa ASP – GLU – gruppo C=O del loop
- nella proteina a cui è isolata questa struttura→5° e 6° elica (E e F)
- struttura a forcina (*harpin – structure*) con filamenti antiparalleli
- struttura a chiave greca (filamenti antiparalleli)
- beta – alfa elica – beta

I MOTIVI→semplici combinazioni di pochi elementi di struttura 2° con uno specifico arrangiamento spaziale.

LOOP: struttura con + di 2 aa e mobile

BETA – TURN: struttura rigida e definita

GERARCHIA STRUTTURALE:

- struttura primaria (sequenza aa)
- struttura secondaria (alfa – elica; beta – sheet; loop)
- struttura supersecondaria (motivi semplici)
- struttura terziaria (domini compatti formati da diversi motivi)
- struttura quaternaria (diversi peptidi con diversi domini che interagiscono tra di loro)

Dominio: unità fondamentale di struttura terziaria; una catena (o parte di essa) che può indipendentemente ripiegarsi in una struttura terziaria stabile. Sono unità funzionali.

Proteine fatte da 1 o + domini ad esempio nella sintesi di acidi grassi si ha 1 proteina con 7 domini (nei mammiferi) e 7 proteine con 7 domini (nelle piante)

COME PREVEDERE la struttura dalla SEQUENZA:

Alfa – elica	ALA – CYS – LEU – MET – GLU – GLN – HIS – LYS
Beta – sheet	VAL – ILE – PHE – TYR – TRP – THR
Ripiegamento	GLY – SER – ASP – ASN – PRO

COME un peptide può assumere la sua forma 3D: è scritta nella sequenza aa. Se si denatura e poi rigatura→nella sequenza aa c'è l'informazione x raggiungere la forma 3D. La struttura può essere assunta grazie ai *legami H*, *legami ionici*, *interazioni di Van der Waals*.

Una proteina passa dallo stato disordinato ad uno ordinato per cui si ha un aumento di ENTROPIA.

PROTEIN FOLDING:

- $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
- aumenta l'ordine nella struttura della proteina
- l'entropia diminuisce
- quindi occorre ΔH negativo o un altro aumento di entropia
- ΔH è negativo se hanno luogo interazioni favorevoli tra gruppi della proteina: *interazioni elettrostatiche* (ponti salini, pH); *legami H intermolecolari*, *interazioni di Van der Waals*
- la sfavorevole entropia del folding è compensata dal contributo favorevole dell'entalpia
- effetto idrofobico→porta ad un aumento dell'entropia complessiva del sistema(proteina + H_2O)

1900→riscoperta di Mendel

2001→sequenziamento genoma umano:

- FASE 1: teoria cromosomica dell'eredità
- FASE 2: basi molecolari dell'eredità
- FASE 3: decifrazione del codice genetico
- FASE 4: decifrazione geni e menoma

GENOMA→insieme dell'informazione genetica in una cellula

PROGETTO INTERNAZIONE GENOMA UMANO:

Obiettivi principali:

- mappe genetiche e fisiche dettagliate
- individuazione di tutti i geni umani (50 – 100000)
- sequenziamento completo del menoma umano (3 miliardi di paia di basi o 3000 Mb; Mb=mega base – pair)
- definizione aspetti etici, sociali e legali

Obiettivi collaterali:

- mappatura e sequenziamento di organismi modello come *E.Coli*, *Saccaromiches cerevisae*, *arabidopsis thaliana*, *C.elegans*)

PREMESSE ESSENZIALI:

- investimenti (centinaia di milioni di dollari/anno)
- costituzione di organismi internazionali

AVANZAMENTI TECNOLOGICI:

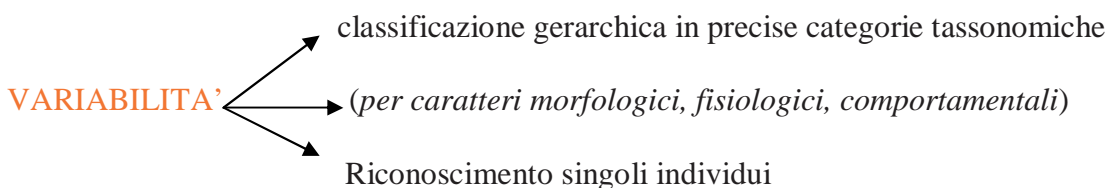
- chimica→sequenziamento e sintesi del DNA
- ingegneria→sequenziatori automatici, robotica
- informatica→banche dati, algoritmi
- biologia molecolare→marcatori molecolari, vettori di clonazione, sistemi di trasformazione

GENOMI SEQUENZIATI:

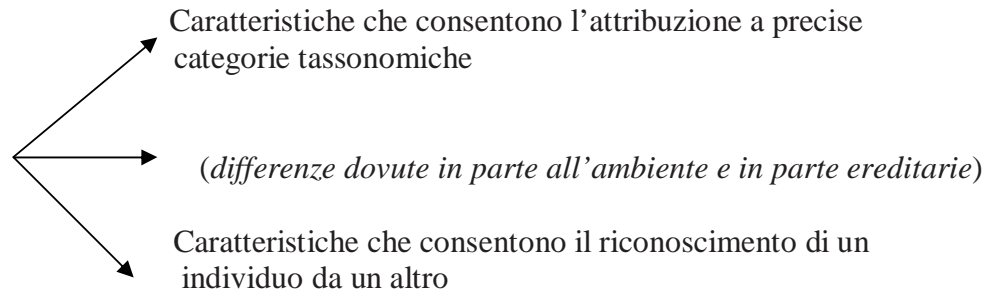
599 virus e viroidi; 205 plasmidi; 185 organelli; 31 eubatteri; 2 archea; 1 fungo; 2 animali; 1 pianta

CARATTERI GENERALI GENOMA UMANO:

- 22 coppie di cromosomi omologhi + 1 coppia di cromosomi sessuali (X e Y)
- complessità: 3200Mb (1 Mb = 1 milione di base – pair)
- 30 – 40.000 geni che codificano prodotti proteici
- dimensioni medie di un gene: 30.000 Bp (base – pair) di cui solo $\frac{1}{5}$ codificante
- $\frac{1}{3}$ del menoma è trascritto
- solo 1.5% codifica per proteine



MANTENIMENTO ATTRAVERSO LE GENERAZIONI

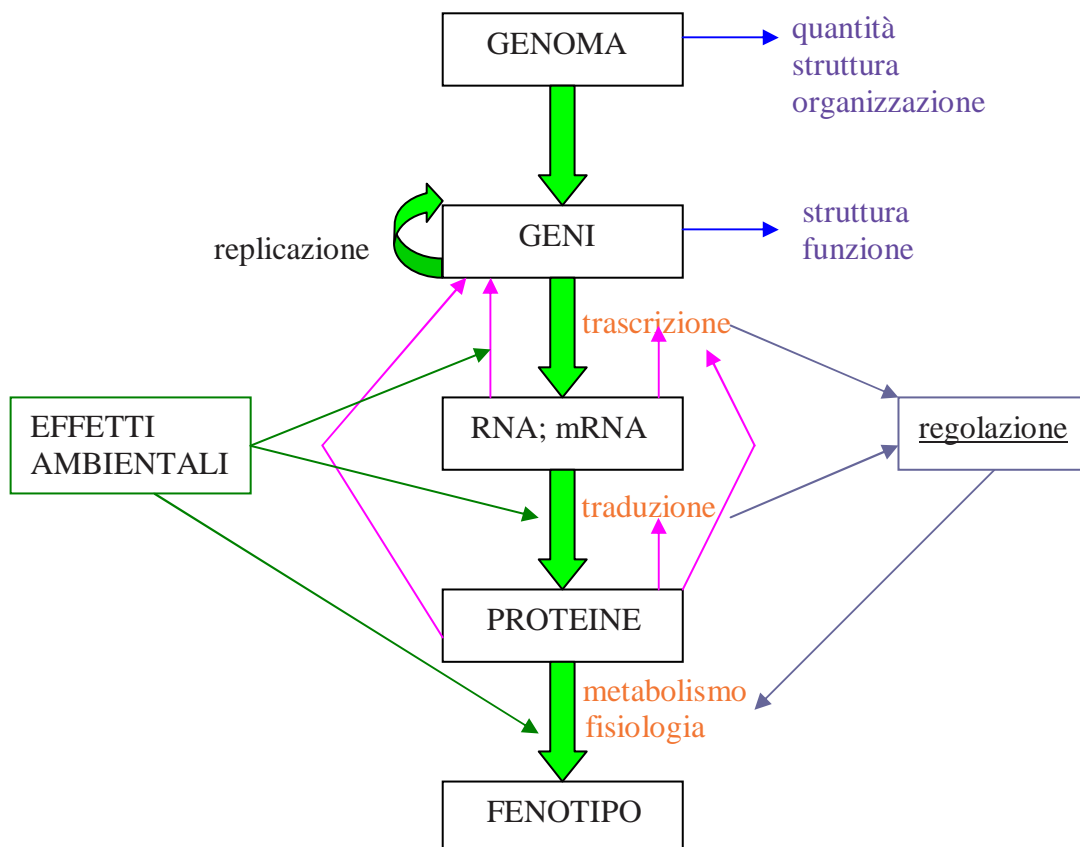


La capacità di trasmettere le proprie caratteristiche biologiche risiede ne MATERIALE GENETICO
Occorrono però requisiti essenziali x rispondere alla funzione:

- contenere tutta l'informazione
 - replicarsi esattamente
 - avere una struttura stabile
- } **DNA**

Il materiale genetico quindi è il DNA che contiene l'informazione e tutte le caratteristiche dell'individuo e ne assicura la trasmissione che avviene secondo 2 meccanismi:

- la **mitosi** → da uno zigote a tutte le cellule e si ha la *costanza* del DNA in tutte le cellule
- la **meiosi** → da una generazione alla successiva e si ha il *riassorbimento* genetico: gameti ≠



ESPERIMENTO di GRIFFIN→virus R e S

AVERY, Mc Lead, Mc Carthy→frazionamento→estratto→ac. Nucleici→solo frazione contenente DNA→trasformazione: AVIRULENTO→VIRULENTO; controprova: estratto + proteasi + Rnasi→effetto invariato; estratto + Dnasi→non + efficace; interpretazione→DNA induce mutazioni specifiche ed è il materiale genetico.

ESPERIMENTO di HERSHEY e CHASE→batteri su terreno radioattivo x dimostrare che il DNA è il materiale ereditario.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Se ΔG è negativo la proteina passa dallo stato disordinato ad ordinato; **la perdita di struttura porta ad una perdita di funzione.**

NUCLEAZIONE→formazione iniziale di segmenti ad alfa – elica e beta – sheet (denaturata)

CONSOLIDAMENTO→strutturale e ripiegamento 3°

RIARRANGIAMENTI→finali, proteina nativa.

COMPONENTI ACIDI NUCLEICI:

- polimeri
- monomeri sono i nucleotidi→**base azotata** + **gruppo fosfato** + **zucchero** (ribosio)
- la **base** è legata al **C1**
- i **gruppi fosfato** sono in posizione **5 – 3**
- nucleotidi→DNA e RNA
- **NUCLEOSIDE**→base + zucchero (non c'è il fosfato)
- Il DNA è un eteropolimero
- Ribosio/desossiribosio = pentosi in cui al **C1** si attacca la **base**; il **C2** è la differenza tra ribosio (**H**) e desossiribosio (**OH**); il **C3 e C5** legano il **P**

BASI AZOTATE:

PIRIMIDINE→

- anello eterociclico di atomi C e N
- citosina (DNA – RNA)
- uracile (RNA)
- timina (DNA)
- 1 sito di legame tra base e zucchero
- 3 siti di legame tra base e base

PURINE→

- 2 anelli fusi di 5 e 6 elementi
- adenina: 2 legami H
- guanina: 3 legami H

POLIMERIZZAZIONE:

- legame fosfo – diesterico
- zucchero – fosfato – zucchero→ossatura della catena polinucleotidica
- 3 gruppi fosfato: alfa; beta; gamma
- il gruppo P alfa si lega al C3 del nucleotide già stato incorporato
- è presente un *nucleotide trifosfato* perché occorre enel x la polimerizzazione e libera P—P (*pirofosfato*)
- il P alfa fa da ponte ai 2 pentosi

ROSALIND FRANKLIN→

- cristallizzazione del DNA
- analisi di diffrazione del DNA a raggi X

- elica destrorsa
- passo di 3.4 Å ($1^\circ = 1 \times 10^{-10}$ m)

PRESUPPOSTI WATSON e CRICK (1953)→

- 1) caratteristiche fisiche dell'analisi di rifrazione ai raggi X
- 2) regola di Erwin Chagaff: -
 - la quantità delle diverse basi non è fissa (in specie diverse si hanno proporzioni diverse)
 - rapporto *purine/pirimidine* è sempre ~ 1
 - rapporto A/T e G/C è sempre $= 1$

STRUTTURA→

- antiparallela
- ossatura P—zucchero
- legami tra basi complementari
- i legami tra le basi sono legami H

CONSEGUENZE→

- 1) ipotesi meccanismo di replicazione
- 2) chiave di lettura sulla natura molecolare dell'informazione genetica
 - sequenza di basi
 - meccanismi di variazione
 - ricadute metodologiche→ibridazione molecolare

MODELLI DI REPLICAZIONE:

- 1) semiconservativo (no – rottura elica)
- 2) conservativo (no – rottura elica)
- 3) dispersivo (l'elica si frammenta)

ESPERIMENTO di MESELSON e STAHL (1958)

Il modello giusto è quello semiconservativo

MECCANISMI DI REPLICAZIONE:

dogma centrale:

- 1) i geni si perpetuano come sequenze di acidi nucleici (DNA o RNA)
 - 2) la loro funzione è attraverso la produzione di proteine
 - struttura
 - funzione
 - sviluppo
 - riproduzione
- } dipendono dal tipo di proteine

occorrono:

- precursori→nucleotidi trifosfato
- DNA stampo
- Proteine→enzimi che catalizzano la sintesi

5'→3': replicazione e trascrizione

La POLIMERIZZAZIONE avviene in direzione 5'→3'

I precursori sono i nucleotidi trifosfato

Occorre un nucleotide con un OH in 3' libero

REPLICAZIONE:

- 1) DNA da replicare
- 2) Precursori: nucleotidi 3P
- 3) ENZIMI di replicazione:
 - **dna – polimerasi** → sintetizzano DNA ex-novo; complessi enzimatici grandi; vari tipi; altre attività enzimatiche (controllo)
 - **enzimi** che mettono la dna – polimerasi in condizioni di operare
 - **enzimi** che completano l'opera

PRODUZIONE DI TERMINAZIONE 3'OH:

Un enzima inizia a sintetizzare una piccola sequenza di nucleotidi da un'elica del DNA → vengono fatti piccoli RNA tramite la **dna – primasi**:

Il **PRIMING** → inizio replicazione → **elicasi**: separa le 2 eliche in modo che i legami H non si riformino.

Siccome il DNA a singola elica è debole, occorrono delle particolari proteine: **single strand binding proteins** che tengono aperto il DNA.

Dopo ciò arriva la DNA-PRIMASI.

Nell'**elica leading** la polimerizzazione procede fino in fondo

Nell'**elica lagging** frammenti di OKAZAKI

Dopo occorre eliminare il primer e unire i pezzi tramite la **dna – ligasi**

REPLICAZIONE DEL DNA:

- meccanismo molto accurato
- selezione del materiale
- svolgimento del DNA
- sintesi
- controllo di bozze (senso opposto: da 5' → 3' a 3' → 5')
- *ricadute metodologiche*: strumenti di manipolazione (amplificazione, sintesi, clonazione)

ORGANIZZAZIONE DEL DNA:

Cromatina = DNA + proteine

CARATTERISTICHE CHIMICO – FISICHE ACIDI NUCLEICI:

- assorbanza luce UV lunghezza 260nm
- proteine max assorbanza a 280nm
- rapporto: O.D. (optical density) 280/260 → < 1.8: + bassa è meglio è

DENATURAZIONE DEL DNA:

- da doppia elica a molecola di singola elica (random coil)
- calore → aumento di T → dissociazione delle eliche e + alcali forti
- **temperatura di MELTING (Tm)** → punto di mezzo della T per la denaturazione
- denaturando il DNA aumenta l'assorbanza
- non tutti i DNA hanno la stessa Tm perché il legame C—G (C + G) ha + legami H e quindi la Tm è maggiore
- il DNA → RINATURAZIONE (dipende dalla lunghezza e dalla concentrazione) formazione dei legami tra basi complementari

METODO DI SANGER

SINTESI PROTEICA

RIBOSOMI

SINTESI PROTEICA:

DNA → trascrizione → RNA → traduzione → POLIPEPTIDE

tRNA:

- adattatore
- singola elica a forma di trifoglio x appaiamenti intramolecolari
- anticodone
- sito accettare dell'aa in 3'
- aa legato covalentemente

RIBOSOMI:

- 2 subunità = 70S (- Mg⁺⁺; + Mg⁺⁺) ↔ 50S e 30S
- siti della traduzione
- particelle con rRNA e proteine ribosomiali
- coefficiente di sedimentazione = **SVEDBERG** (S) che dipende da massa e forma
- > massa > tasso di sedimentazione > S
- alti e lunghi 200 Å
- 2 tRNA all'interno
- la subunità + piccola interagisce con l'mRNA; poi si posiziona la subunità superiore con 2 siti attivi x la tRNA; la lettura procede da SINISTRA a DESTRA →; le 2 subunità si dissociano e si libera l'mRNA che può essere tradotto + volte e poi degradato

TRASCRIZIONE:

- 1 elica di DNA funge da stampo x RNA
- RNA sintetizzato ha sequenza = alla complementare
- **Elica STAMPO** → RNA
- **Elica CODIFICANTE** → sequenza = all'RNA prodotto
- L'enzima → **rna – polimerasi** (5' → 3')
- I tipi di RNA → *rRNA*; *tRNA*; *mRNA*; *smRNA* (small o piccolo RNA che codifica il segmento d'innesco per la replicazione: il primer)

RNA POLIMERASI:

- la trascrizione: **rna – polimerasi**
- è un complesso enzimatico
- interagisce con altre proteine detti fattori trascrizionali
- un tipo di RNA – polimerasi → un tipo di RNA
- DNA dipendenti
- **Rna – pol 1** → rRNA
- **Rna – pol 2** → mRNA
- **Rna – pol 3** → tRNA e sRNA

DEFINIZIONI:

- **elica codificante** o “senso” (coding strand) → stessa sequenza mRNA 5'p_____OH 3'
- **elica stampo** o “antisense” (template strand) → dirige la sintesi dell'mRNA mediante appaiamento delle basi complementari 3'OH_____p5'
- **mRNA** → molecola stampo x sintesi proteica
- **rapporto lineare mRNA – peptide** 5'p_____OH3' e NH₃-----COOH

mRNA:

- +lungo della proteina
- presenta pezzi che non vengono tradotti

- NUCLEOTIDE + 1 → nucleotide sull'elica codificante che è il 1° NT della sequenza mRNA e costituisce lo STARTPOINT
- La sequenza prima dello STARTPOINT → regolazione del gene x trascrizione ed è detta PROMOTRICE
- UPSCREAM → a monte: il promotore
- DOWNSCREAM → a valle
- La posizione vicino allo STARTPOINT → PROSSIMALE e man mano → DISTALE
- In posizione DISTALE a valle → segnale → TERMINAZIONE
- RNA maturo è + corto della sequenza del gene che lo codifica
- Ibridazione gene – rna → ci si aspetta una doppia elica ma avanzano porzioni lunghe a singola elica
- **ESONI** → sequenze trascritte e tradotte
- **INTRONI** → sequenze trascritte ma non tradotte perché vengono eliminate nel nucleo con lo SPLICING
- Alla terminazione dell'mRNA → tanti AAAAAAAAAA → coda di poly (A) inserita dopo la trascrizione: POLY(A)TAIL; solo mRNA e indica la terminazione
- 5'CAPPING → dopo la trascrizione: aggiunta di una G terminale in 5' in direzione opposta; legame trifosfato 5'—5'; diversi gradi di mutilazione (dopo il capping); ad opera della **guanilina – transferasi**

TRASCRIZIONE → POLY(A)TAIL → CAPPING → METILAZIONE → SPLICING

- CINETICA ENZIMATICA –

ENZIMI:

- CATALIZZATORI → aumenta la V di una reazione chimica senza subire trasformazioni durante l'intero processo
- PROTEINE → gli enzimi sono proteine di struttura 3° o talora 4°
- SUBSTRATO → sostanza su cui agisce l'enzima [S]
- INALTERATO nel processo e NON influiscono sull'equilibrio della reazione ma ne aumentano la velocità
- ALTAMENTE SPECIFICI → un enzima è specifico per un substrato
- TAMPONE → mantengono costante il pH del sangue:

$$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \longleftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \longleftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \quad (\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-)$$
- NUMERO DI TURNOVER → n° di molecole di S trasformate in P in **1 sec** da 1 molecola di E quando è nelle migliori condizioni (saturato)

NOMENCLATURA – CLASSIFICAZIONE:

- nome del substrato + **-asi**
- 4 numeri → codice
- 6 classi:

CLASSE	REAZIONE
1	Ossidoriduttasi
2	Transferasi
3	Idrolasi
4	Liasi
5	Isomerasi
6	Ligasi

STRUTTURA:

- 1 o + proteine globulari
- possono funzionare tal quali (solo struttura proteica) o solo con **COFATTORI** (ioni metallici o molecole organiche)
- **OLOENZIMA = APOENZIMA** (enzima solo proteico) + **COFATTORE**

└───────────> Proteina coniugata
- COFATTORI ORGANICI o COENZIMI → NAD, FAD, ATP, CoASH

SITI ATTIVI:

- l'enzima si lega al substrato → E-S (complesso ATTIVATO)
- il S si trasforma in P e l'E diventa libero
- $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$
- E è + grande di S → solo alcune regioni dell'E sono catalitiche
- SITI CATALITICI o ATTIVI → struttura 3° della proteina e i residui amminoacidici responsabili dell'attività sono: -OH; -SH; -NH₂; -COOH; e quelli in grado di fare ponti H
- la > parte degli aa degli enzimi → **favoriscono l'ORIENTAMENTO E-S**
- MODELLO di FISCHER → *chiave – serratura*: l'E ha conformazione rigida complementare a quella del S
- MODELLO dell'ADATTAMENTO INDOTTO → l'avvicinarsi di S a E modifica la struttura di E (in modo reversibile) e migliora la reciproca aderenza

ATTIVITA' ENZIMATICA e PARAMETRI REGOLATORI:

- azione catalitica dell'enzima → scelta del percorso con < E_{att.} (enel di attivazione)
- fattori chimico – fisici che influenzano l'azione catalitica dell'enzima sono:
 - 1) [S]
 - 2) [E]
 - 3) pH
 - 4) T
 - 5) inibitori
 - 6) attivatori

1) [S]:

- dipendenza della V di reazione dalla [S] → equazione di Michaelis-Menten: $V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$
- alla V_{max} tutti i siti sono saturati
- **K_m** (costante di Michaelis) → [S] alla quale la V di reazione è = ½ V_{max}
→ affinità dell'E nei confronti di S
→ valori piccoli di K_m → E alta affinità per S

2) [E]:

- proporzionalità diretta tra V di una reazione enzimatica in funzione di [E]

3) pH:

- modificazione della dissociazione dei residui aa del SITO ATTIVO (la sua forma) e della dissociazione dei gruppi del substrato (il suo riconoscimento)
- pH OTTIMALE di funzionamento → **4 – 9**

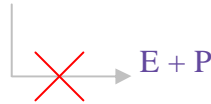
4) T:

- un aumento di T (temperatura) → crescita esponenziale della V di reazione di un enzima senza però raggiungere la DENATURAZIONE

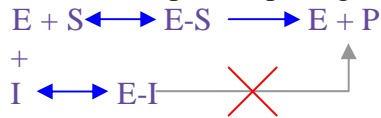
5) INIBITORI:

- rallentare la V di una reazione enzimatica e possono essere IRREVERSIBILI o REVERSIBILI

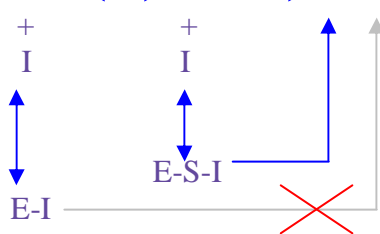
- **INIBIZIONE IRREVERSIBILE** → le molecole dell'I si legano irreversibilmente ai residui del sito attivo → E-I: $E + I + S \rightleftharpoons E-I + S$



- **INIBIZIONE REVERSIBILE** → può essere **COMPETITIVA** o **NON-COMPETITIVA**
- **INIBIZIONE REVERSIBILE COMPETITIVA** → molecole di S e I sono strutturalmente simili e competono per legarsi reversibilmente al sito attivo:

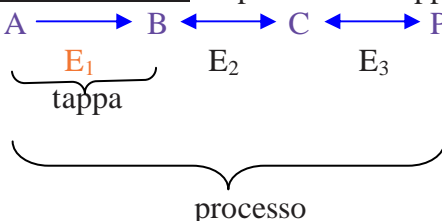


- **INIBIZIONE REVERSIBILE NON-COMPETITIVA** → le molecole di I possono legarsi con E o ES in un sito diverso da quello catalitico: **allosterico** → deformazione dell'enzima e S interagisce + difficilmente con E. In questo caso indipendentemente da [S] la V di reazione si abbassa: $E + S \rightleftharpoons E-S \rightarrow E + P$



REGOLAZIONE OPERATA DA ENZIMI:

ENZIMA REGOLATORE → opera su una tappa irreversibile e fra le prime di un processo metabolico:



ENZIMI ALLOSTERICI → proteine 4° che hanno

SITO ATTIVO

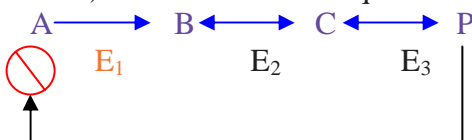
SITO ALLOSTERICO

 in cui si inseriscono **modulatori** positivi o negativi del sito attivo catalitico e lo stabilizzano.

Se sono regolati da modulatori diversi da S → **ENZIMI AD EFFETTO ETEROTROPO**

Se sono regolati da modulatori uguali ad S → **ENZIMI AD EFFETTO OMOTROPO**

Un esempio di **REGOLAZIONE ALLOSTERICA OMOTROPA** → **inibizione retroattiva** (feedback) in cui il P di una sequenza metabolica inibisce l'azione del primo E della sequenza stessa:



EFFETTO COOPERATIVO → l'entrata di una molecola di S in una subunità facilita l'entrata delle altre e viceversa:

- $< [S]$ la V di reazione cresce lentamente
- $[S]$ intermedia, piccole aggiunte di S → grande aumento della V di reazione
- $> [S]$ la V di reazione diventa costante e = alla V_{max}
- la curva da iperbole diventa perciò sigmoide

- MIOGLOBINA ED EMOGLOBINA -

Mb → proteina di immagazzinamento di O₂

Hb → proteina trasportatrice di O₂

TRASPORTO e IMMAGAZZINAMENTO di O₂:

Hb e Mb: immagazzinamento e trasporto di O₂ → metabolismo aerobico: - assicurare apporto di O₂
- Eliminare gli scarti (CO₂)

Hb: proteina trasportatrice che lega l'O₂ nei polmoni o branchie e lo distribuisce nei tessuti

Mb: proteina che serve ad alcuni tessuti che hanno bisogno di grandi riserve di O₂

Mb → singola catena polipeptidica ripiegata attorno ad un *gruppo prostetico*: **EME** → sito legame O₂

Hb → proteina tetramerica con le catene simili alla Mb

MECCANISMO di LEGAME con O₂:

- legare O₂
- impedirne l'ossidazione
- rilasciarlo in risposta a specifiche richieste

SITO di LEGAME per O₂:

- al centro di un anello tetrapirrolico detto **protoporfirina IX** → **Fe²⁺**
- il Ferro porfirinico → colore rosso del sangue

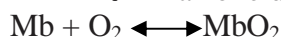
L'**EME** è legato non – covalentemente alla Mb o Hb accomodato in una tasca idrofobia

- il Fe → **6 ligandi**: 4 con gli atomi di N; 1 con His F8 (prossimale) e 1 con His E7 (distale)
- His E7 — O₂ — **Fe(eme)** — His F8

Hb e Mb → protezione di un metallo in grado di legare O₂ ma dall'ossidazione irreversibile

ANALISI LEGAME O₂ dalla Mb:

- **Mb**: lega O₂ rilasciato dall'Hb nei vasi e capillari arteriosi e la Mb lo rilascia agli organuli
- **Legge di HENRY**: la [] di un gas disciolto in un liquido è proporzionale alla P parziale di quel gas sopra al liquido → **[O₂] = PO₂**
- **θ** = frazione di siti di Mb legati all' O₂ e dipende dalla [O₂] = dalla PO₂ dell'ossigeno libero



$$K = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}][\text{O}_2]} \rightarrow [\text{MbO}_2] = K * [\text{Mb}][\text{O}_2]$$

molteplico e divido per 1/K



$$\theta = \frac{\text{siti occupati}}{\text{totale siti disponibili}} \rightarrow \theta = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{MbO}_2] + [\text{Mb}]} \rightarrow \frac{K[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{Mb}] + K[\text{Mb}][\text{O}_2]} \rightarrow \frac{K[\text{O}_2]}{1 + K[\text{O}_2]} \rightarrow \frac{[\text{O}_2]}{1/K + [\text{O}_2]} \rightarrow$$

$$\rightarrow \frac{[\text{O}_2]}{[\text{O}_2]^{1/2} + [\text{O}_2]} \rightarrow \theta = \frac{\text{PO}_2}{\text{P}_{50} + \text{PO}_2}$$

- **P₅₀** bassa = alta affinità della Mb per l'O₂

TRASPORTO DI O₂: Hb:

LEGAME COOPERATIVO e ALLOSTERIA:

Hb → accettare efficacemente O₂ alla PO₂ nei polmoni (~100 mm Hg)

→ cederne una frazione ai tessuti a PO₂ ~ 30-40 mm Hg

→ a < PO₂: la proteina si comporta come se legasse O₂ molto debolmente e man mano che l'O₂ aumenta → > affinità → interazione cooperativa: l'occupazione dei primi siti aumenta

l'affinità all'O₂ per gli altri siti

→ comunicazione reciproca tra i siti di legame → SUBUNITA' di proteina MULTIMERICA (Hb)

→ struttura tetramerica
 → lega 4 O₂ in 4 siti simili a Mb
 → grafico di HILL: quando l'Hb inizia a legare O₂ il grafico di Hill ha pendenza = 1 (bassa affinità; alta P₅₀) e viceversa. Misura del grado di cooperatività → **coefficiente di Hill: n_H** →
 $n_H = 1$: lega in modo non cooperativo
 $1 < n_H < n$: proteina cooperativa
 $n_H = n$: completamente cooperativa
 → Il legame cooperativo dell'O₂ dall'Hb → effetto **allosterico**: O₂ su un ligando → influisce su altri ligandi


VARIAZIONI della Hb che ACCOMPAGNANO il LEGAME dell'O₂:

Hb → 2 catene α e 2 catene β (α₂β₂); i legami + forti sono tra α e β
 → i gruppi EME sono in prossimità della superficie ma non vicini l'uno all'altro
 - **l'ossigenazione** → una coppia α-β ruota e scivola rispetto all'altra → le catene β + vicine tra loro e si crea un restringimento della cavità
 - la **transizione** da **deossiHb** a **ossiHb** → spiega la cooperatività del legame

EFFETTI DI ALTRI LIGANDI sul COMPORTAMENTO ALLOSTERICO dell'Hb:

- quando O₂ è consumato nei tessuti → CO₂ che deve essere allontanata e causa un abbassamento pH negli eritrociti secondo la seguente reazione:
- $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ (*anidrasi-carbonica*)
- in deficit di O₂ nei muscoli → acido lattico → abbassamento pH
- < pH in vasi e tessuti → > apporto di O₂ → **EFFETTORI ALLOSTERICI**


RISPOSTA ai CAMBIAMENTI di pH: l'EFFETTO BOHR:

- caduta di pH → <affinità dell'Hb per l'O₂ → > rilascio delle ultime tracce di O₂ presente
- 

EFFETTO BOHR
- $\text{Hb} \cdot 4\text{O}_2 + n\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Hb} \cdot n\text{H}^+ + 4\text{O}_2$
- gli H⁺ spostano l'equilibrio a destra perché promuovono il rilascio di O₂
- quando si ha ossigenazione nei polmoni → rilascio di H⁺ → equilibrio verso sinistra inoltre gli H⁺ liberano il bicarbonato disciolto nel sangue invertendo la reazione: la CO₂ può quindi essere espirata

IL BISFOSFOGLICERATO:

- H⁺ e CO₂ → effettori che facilitano lo scambio di O₂ e CO₂ in modo veloce nel ciclo respiratorio
- Un altro effettore allosterico è il 2,3-BPG → diminuisce l'affinità dell'Hb per l'O₂ e favorisce l'adattamento a < pressione di O₂
- Si lega nella cavità tra le catene β instaurando interazioni allosteriche con i gruppi +



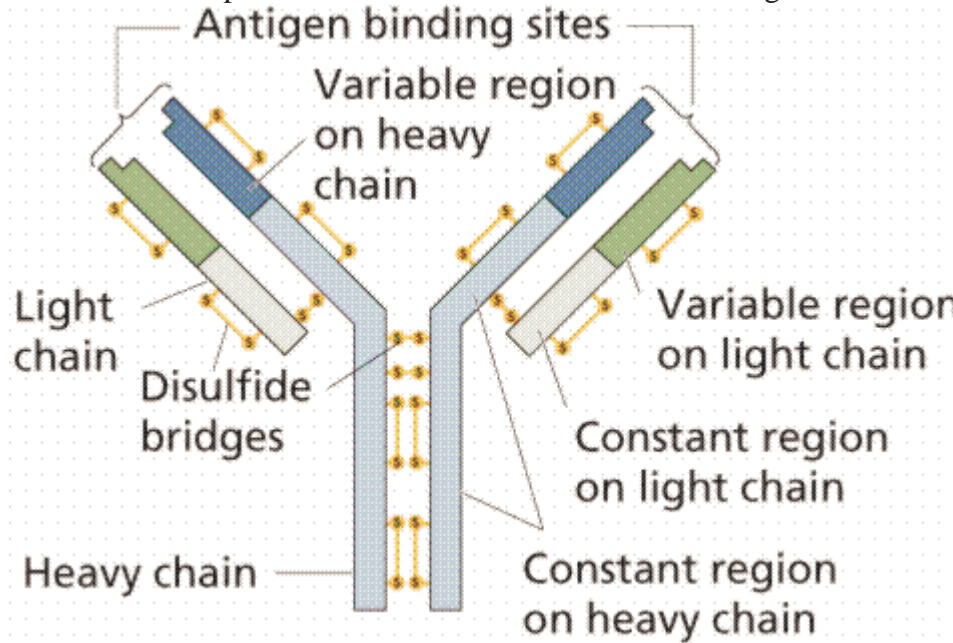
+ stretta nella OSSIHb → 2,3-BPG non può adattarsi
- > contenuto di 2,3-BPG negli eritrociti → + stabile la struttura deossiHb
- **HbF** → emoglobina fetale con catene γ (α₂γ₂) + affine all'O₂; < affinità per il 2,3-BPG

IMMUNOGLOBULINE:

LA STRUTTURA degli ANTICORPI:

- 2 catene pesanti e 2 leggere legate le une alle altre con ponti disolfuro

- in ogni catena → domini costanti (= in tutti gli Ab di una stessa classe) e dominio variabile (le variazioni della sequenza aa di questo dominio conferiscono agli Ab diversi tipi di specificità)
- sito di legame per l'antigene → estremità terminale dei domini variabili e coinvolge i residui aa delle regioni variabili sia delle catene pesanti che di quelle leggere
- DOMINI COSTANTI di CATENE PESANTI nella base della molecola a forma di Y servono a tenere unite le catene e fungono da effettori segnalando ai macrofagi nel sistema circolatorio di attaccare particelle o cellule marcate mediante un legame di un anticorpo.



TEORIA DEL METABOLISMO

La GLICOLISI:

- processo metabolico
- avviene nel cervello e tessuto nervoso, muscolo, midollare del rene, eritrociti
- nel citoplasma
- ad opera di enzimi
- l'**esokinasi** è inibita dal suo prodotto: G6P
- la **fosfofruttokinasi1** è inibita dall'ATP e dal CITRATO; l'ADP invece è stimolante
- la **piruvatokinasi** è attivata a valle se la [F1,6BP] è alta
- è meglio regolare l'enzima di una reazione irreversibile
- 10 tappe in 2 fasi (la 1° → investimento di ATP; la 2° → produzione di ATP)
- nella tappa 6 il **NAD⁺** viene recuperato con la **fermentazione** o con la **catena respiratoria**
- da 1 molecola di glucosio → 2 molecole di piruvato
- guadagno netto: **4 ATP**

La DECARBOSSLAZIONE del PIRUVATO:

- eliminazione di una molecola di CO₂
- enzima irreversibile: *piruvato deidrogenasi*
- utilizzo di **CoASH** → **ScoA** — **Acetil** (Acetyl CoA)

Il CICLO di KREBS:

- processo metabolico
- nei mitocondri

- ad opera di enzimi
- 9 tappe
- glucosio ossidato a 6CO_2
- guadagno netto: **24 ATP**
- il piruvato è inibito da: **AcetilCoA; NADH; ATP**; è attivato dall'**ADP**
- l'alfa-ketoglutarato è inibito dal **NADPH** e attivato dall'**ADP**
- il succinilCoA è inibito dal **NADH**
- l'ossalacetato è inibito dal **NADH**
- le **USCITE del CICLO di KREBS** sono:
 - 1) isocitrato \rightarrow acidi grassi, steroli
 - 2) alfa-ketoglutarato \rightleftharpoons acido glutammico \rightarrow diversi aa (x transaminazione)
 - 3) succinilCoA \rightarrow eme, clorofilla
 - 4) ossalacetato \rightleftharpoons aspartato (x transaminazione)

Le **REAZIONI ANAPLEURICHE** (di riempimento):

- 1) **piruvato – carbossilasi**: tramite l'enzima *piruvatocarbossilasi*. Occorre $\text{HCO}_3^- + \text{ATP}$ e il coenzima *biotina* per legare la CO_2 (grazie ad ATP) e la trasferisce sulla molecola del piruvato
- 2) **pep – carbossilasi**: tramite l'enzima *pepcarbossilasi*. Avviene solo in piante e batteri e occorre HCO_3^-

La **GLUCONEOGENESI**:

- avviene nel fegato; corticale del rene (muscolo)
- i substrati sono: lattato; aa; glicerolo; acidi grassi (no x mammiferi)
- dal **piruvato** \rightarrow **ossalacetato** tramite la *piruvatocarbossilasi*
- dall'**OAA** \rightarrow **PEP** tramite la *pepcarbossikinasi*
- ... (= a glicolisi)
- da **F1,6BP** \rightarrow **F6P** tramite la *fruttosio-1,6-bisfosfatasi*
- da **G6P** \rightarrow **G** tramite la *glucosio6fosfatasi*

La **CATENA di TRASPORTO degli ELETTRONI**:

- **sistema I** \rightarrow trasferire e- dal NADH al CoQ (*NADH-Q riduttasi*)
- **sistema II** \rightarrow in flavoproteine: trasferire e- da FADH_2 e Q
- **sistema III** \rightarrow *cytocromo-riduttasi* \rightarrow *cytocromo C*
- **sistema IV** \rightarrow *cytocromo ossidasi*: gli e- arrivano sull' O_2
- produrre ATP da $\text{ADP} + \text{Pi}$
- il trasporto di e- avviene sulla cresta mitocondriale
- i sistemi sono complessi proteici che permettono il trasporto di e-
- il trasporto di e- è secondo gradiente elettrochimico ed è esoergonico
- nel sistema 1 e 2 \rightarrow centri Ferro – zolfo
- i citocromi sono una classe di proteine che trasportano e- e contengono un gruppo EME
- **RAPPORTO P/O** = ATP formato/ O_2 consumato

La **SINTESI di ATP**:

Le creste mitocondriali sono ricche di sfere sporgenti

Nella membrana interna:

- vescicole inside – out
- consumo di O_2
- ATP form

Dalle vescicole è possibile misurare il consumo di O_2 e la formazione di ATP.

Se si prelevano le vescicole e si staccano le sferette \rightarrow le vescicole trasportano elettroni mentre le sferette sono capaci di idrolizzare ATP se isolate. La sferetta F1 \rightarrow ATP-sintetasi solo se accoppiata alla vescicola.

Teoria chemiosmotica: accoppiamento tra la sintesi di ATP e il trasporto di elettroni; non può esserci trasporto di elettroni (quindi consumo di O_2) se non c'è la sintesi di ATP e viceversa.

ESPERIMENTO 1: si preparano dei mitocondri e in funzione del tempo si misura la quantità di O_2 consumata per cui deve essere dato un substrato respiratorio. Se i mitocondri recuperano l'ossigeno (linea in discesa) altrimenti una linea orizzontale. Se oltre al glutammato forniamo $ADP + Pi$, la linea scende rapidamente; quando l' ADP finisce l'andamento rallenta. Se non c'è ATP il consumo di O_2 è molto lento.

ESPERIMENTO 2: anziché aggiungere ADP si aggiunge il DINITROFENOLO (DNF)→il consumo di O_2 procede rapidamente. Il DNF è un agente disaccoppiante cioè separa il consumo di O_2 dalla produzione di ATP . I mitocondri se sono disaccoppiati consumano ossigeno ma non producono ATP . L'energia liberata nel trasporto di elettroni viene rilasciata.

Il DNF permette di dissipare il gradiente protonico senza che questo passi nei complessi F_0 e F_1 .

- L'accoppiamento serve per un grosso lavoro cellulare che consuma ATP e produce ADP . Se ADP è alto il trasporto di elettroni procede velocemente e si può formare molto ATP →controllo respiratorio a livello di ADP .
- **Attività intensa**→crolla ATP e aumenta ADP , stimola la respirazione cellulare.
- **Attività lenta**→poco ADP e quindi respirazione lenta; produce ATP solo se necessario.